



TITLE:

線虫 *Caenorhabditis elegans* における酸化損傷ヌクレオチド分解機構に関する研究(Digest_要約)

AUTHOR(S):

真田, 悠生

CITATION:

真田, 悠生. 線虫 *Caenorhabditis elegans* における酸化損傷ヌクレオチド分解機構に関する研究. 京都大学, 2013, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2013-11-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17944>

RIGHT:

許諾条件により要旨は2014-11-01に公開; 学位規則第9条第2項により要約公開

学位申請論文要約

線虫 *Caenorhabditis elegans* における酸化損傷ヌクレオチド分解機構に関する研究

真田 悠生

背景

酸素は呼吸を行う生物にとって欠かせない分子であるが、反応性の高い分子を生じる為危険な側面を持っているともいえる。このような反応性の高い分子群（ROS）の蓄積によって酸化ストレスとなり、ROS と DNA と反応すると DNA 酸化損傷が生じる。DNA 酸化損傷の 1 つである 8-oxoguanine（8-oxoG）は突然変異を誘発するほか、細胞の機能不全や細胞死、がんの原因になることが報告されている。生物はこの 8-oxoG の悪影響を避けるための修復機構を備えている。例えば、大腸菌 MutT は dGTP の酸化損傷である 8-oxo-dGTP やその前駆体となる 8-oxo-dGDP を分解し、8-oxo-dGTP の増大を抑えることで、8-oxoG による突然変異を抑える役割を持っている。本研究では線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)を用いて、酸化損傷ヌクレオチドが生体に及ぼす影響を調べた。線虫は老化や発生の研究によく用いられるモデル生物であり、酸化ストレスと老化・発生の関連を調べるのに適していると考えられる。本研究では、酸化ストレスが及ぼす影響の 1 つである酸化損傷ヌクレオチド、8-oxo-dGTP や 8-oxo-dGDP が生体にどのような影響を及ぼすかを考察することにした。しかしながら、線虫では 8-oxoG の修復機構に関してはあまり研究が進んでいないという問題があった。そこで、8-oxo-dGTP や 8-oxo-dGDP を分解する酵素を同定することをまず試みた。そして、同定された遺伝子を欠損、ノックダウンした際の影響を調べた。

方法

データベースを利用して、大腸菌 MutT や human の MutT ホモログと配列的に相同性のあるタンパク質（NDX タンパク質）を候補として選び、大腸菌 *mutT* 変異株を用いた相補性実験により、MutT タンパク質と機能が似たものであるかをテストした。大腸菌 *mutT* 変異株を用いた相補性実験で候補と認められたものについては、組み換えタンパク質を精製し、酵素活性を解析した。また、単離されている線虫の遺伝子欠損株、RNAi によるノックダウン法によって候補遺伝子が欠損した際の影響を、“adult stage からの生存率”、“卵から adult stage への到達率”を指標に調べた。酸化ストレス条件下でどのような影響が出るかを考察するため、ROS を産生する薬剤である Methyl viologen, Menadione bisulfite を用いて、フェノタイプ解析を行った。

結果

大腸菌 *mutT* 変異株を用いた相補性実験の結果により、線虫における新規 MutT ホモログとして NDX-1, NDX-2 を候補として選んだ。NDX-1, NDX-2 の組み換えタンパク質を精製し、8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP を substrate とした酵素活性実験を行ったところ、これらのタンパク質は 8-oxo-dGTP は分解しないが、8-oxo-dGDP を分解する活性を持つことがわかった。また、8-oxoG は 8-oxo-GTP が RNA にとりこまれることによっても生じることがわかっている。そこで、NDX-1、NDX-2、NDX-4 の損傷リボヌクレオチドに対する活性を次に調べた。その結果、NDX-1、NDX-2 は 8-oxo-GDP を、NDX-4 は 8-oxo-GTP を分解する酵素活性を持つことが分かった。

次に、*ndx-1*, *ndx-2*, *ndx-4* が線虫の生体内で欠損した場合の影響を調べた。これらの遺伝子が欠損、ノックダウンしたことによる”adult stage からの生存率”、”卵から adult stage への到達率”への影響は見られなかった。しかし、薬剤による酸化ストレス条件下においては、”adult stage からの生存率”、”卵から adult stage への到達率”が低下することがわかった。 ”卵から adult stage への到達率”が低下した際、幼虫期の生存した線虫が観察され、酸化損傷ヌクレオチドが増大した際に、成長をとめたり、遅らせたりする機構の存在が示唆された。そこで、この結果がチェックポイント機構の誘導によるものである、という仮説をたて、次にチェックポイント遺伝子 *chk-2*, *clk-2* のノックダウンによる影響を調べた。その結果、低下した”卵から adult stage への到達率”は、チェックポイント遺伝子のノックダウンにより回復した（レスキューされた）。更に、DNA 修復酵素である *mlh-1*, *nth-1*, *xpa-1* を欠損した際の、”卵から adult stage への到達率”への影響を調べた。これらの修復遺伝子の中で *xpa-1* 欠損により、*ndx* 遺伝子ノックダウンにより低下した”卵から adult stage への到達率”が更に低下することがわかった。また、このとき *chk-2*, *clk-2* ノックダウンによるレスキュー効果は見られなかった。

考察・結論

本研究で新規 MutT ホモログとして NDX-1, NDX-2 を同定した。これらのタンパク質は 8-oxo-dGTP は分解しないが 8-oxo-dGDP を分解する。そして、大腸菌 *mutT* 変異株の突然変異頻度を抑制することから、8-oxo-dGTP の産生を抑え、突然変異頻度抑制に寄与すると考えられる。*ndx-1*, *ndx-2*, *ndx-4* が線虫の生体内で欠損した場合の影響として、薬剤による酸化ストレス条件下において”卵から adult stage への到達率”が低下したが、複数の遺伝子が欠損・ノックダウンしても、更に”卵から adult stage への到達率”が低下するというような現象は見られなかった。この説明の 1 つとして、ある程度損傷ヌクレオチドが蓄積したことにより、成長を止めたり遅らせたりする機構が誘導されたため、というものが挙げられる。実際、チェックポイント遺伝子 *chk-2*, *clk-2* のノックダウンにより、*ndx* 遺伝子ノックダウンにより低下した”卵から adult stage への到達率”がレスキューされたことから、このチェックポイント機構は成長を一旦止めて、修復の時間を確保するために必要である

と考えられる。さらに、線虫を DNA 酸化損傷の研究に応用する際の課題である、DNA 中の 8-oxoG の修復機構の解明に向けた研究も行った。*xpa-1* 遺伝子が欠損すると、*ndx* 遺伝子ノックダウンにより低下した”卵から adult stage への到達率”が更に低下することがわかり、取り込まれた 8-oxoG の修復に XPA-1 が関与している可能性があげられる。

本研究は、酸化損傷ヌクレオチドの修復、および酸化損傷ヌクレオチドの蓄積時に対する生体の応答機構、また 8-oxoG 修復機構の解明に向けた足掛かりを示した。